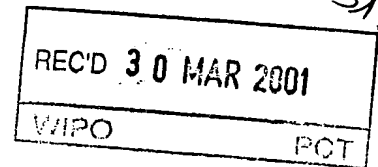


16.03.01

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



09/868576

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1999年10月20日

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第298917号

出 願 人  
Applicant (s):

宮原 孝俊  
内田 和彦  
竹中 繁織

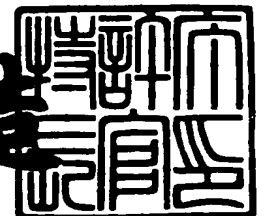
JP00/7342

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 3月16日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3096906

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 P99059MY  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【国際特許分類】 G01N 27/327  
 G01N 33/483

【発明者】  
 【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 5 - 1 6 - 5 2 7 - 2 0 1  
 【氏名】 内田 和彦

【発明者】  
 【住所又は居所】 福岡県古賀市舞の里 4 - 2 3 - 2 1  
 【氏名】 竹中 繁織

【発明者】  
 【住所又は居所】 千葉市美浜区高浜 6 - 1 9 - 1 5  
 【氏名】 宮原 孝俊

【特許出願人】  
 【識別番号】 594079615  
 【氏名又は名称】 宮原 孝俊

【特許出願人】  
 【識別番号】 399045949  
 【氏名又は名称】 内田 和彦

【特許出願人】  
 【識別番号】 399045950  
 【氏名又は名称】 竹中 繁織

【代理人】  
 【識別番号】 100110179  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 光田 敦

【手数料の表示】  
 【予納台帳番号】 064976

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子検出法及び装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 互いに着脱自在な本体部とフレーム部とを有する遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異の検出用チップであって、

上記本体部は、その内側面にマトリックス状に配列されて突出した測定極である多数のピン電極を有し、

上記フレーム部は、その内側面に、上記本体部を装着した際に上記多数のピン電極を受け入れることができるとともに、サンプル DNA を充填することのできる窪みを有し、

上記窪みには、上記ピン電極と接触しないように配置された対極である共通電極が配設されており、

上記ピン電極は、異なる遺伝子配列から成る PCR 産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されており、

上記共通電極と上記ピン電極間に電圧が印加され、電流が検出されることが可能であることを特徴とする遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異の検出用チップ。

【請求項 2】

上記ピン電極は、夫々マトリックス状に多数配列され、異なる遺伝子配列から成る PCR 産物もしくはオリゴヌクレオチドを収容する収容部の各々に、挿入されることにより、上記異なる遺伝子配列から成る PCR 産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されているものであることを特徴とする請求項 1 記載の遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異の検出用チップ。

【請求項 3】 互いに着脱自在な本体部とフレーム部とを有する検出チップ、並びに該検出チップを装入及び取り出し可能な測定装置とから構成される遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異の検出装置であって、

上記本体部は、その内側面にマトリックス状に配列されて突出した測定極である多数のピン電極を有し、

上記フレーム部は、その内側面に、上記本体部を装着した際に上記多数のピン

電極を受け入れることができるとともに、サンプルDNAを充填することのできる窪みを有し、

上記窪みには、上記ピン電極と接触しないように配置された対極である共通電極が配設されており、

上記ピン電極は、異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されており、

上記共通電極と上記ピン電極間に電圧を印加し、電流を検出可能とすることが可能であることを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置

【請求項4】 上記検出チップの温度をペルチエ素子を用いコントロール可能としたことを特徴とする請求項3記載の遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置。

【請求項5】 請求項3又は4記載のフレームの上記窪み内に、サンプルDNA又はサンプルDNAから遺伝子増幅されたDNAを充填し、ハイブリダイゼーションを行わせて二本鎖を形成し、

その後、上記サンプルDNA又はサンプルDNAから遺伝子増幅されたDNAを上記窪みから除去し洗浄してから、上記窪み内に、電気化学活性分子を含む電解質を充填して、温度をコントロールして上記二本鎖に上記電気化学活性分子を結合させ、

そして、上記共通電極と上記ピン電極間に電圧を印加して流れる電流値を検出することにより、サンプルDNAの一塩基置換SNPと点突然変異を検出することを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子の発現など、遺伝子DNAの一塩基置換SNP（シングル・ヌクレオチド・ポリモフィズム：人の遺伝コード中の変種）と点突然変異を検出し解析可能とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップ装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

一塩基置換 SNP とは、ヒト DNA の 1000bp から 2000bp に 1 つあると言われている塩基配列の一塩基変化であり、正常人、病気の間人わず人には数十万から数百万の SNP があると考えられており、病因の解明、予防に有効なマーカーと期待されている。

【0003】

点突然変異とは、すでに既知である遺伝子における塩基配列の一塩基の変化であり、これにより翻訳されるタンパク質の機能異常がみられ、疾患の原因になる場合がある。

【0004】

遺伝子 DNA の塩基配列の違いを検出、解析する手段としては、DNA シーケンス法（塩基配列決定法）、PCR-SSCP (Polymerase chain reaction-single stranded polymorphism) 法、アレル特異的ハイブリダイゼーション法、DNA チップ法等が用いられている。

【0005】

DNA シーケンス法は、マキサム・ギルバート法とサンガー（ダイデオキシ）法があるが、現在は主にダイデオキシ法が用いられている。ヒトの遺伝子の解析したい領域を PCR 法（ポリミラーゼ連鎖反応法）で増幅したのち、PCR 法で用いたプライマー若しくは増幅 DNA 内に設定したプライマーを用いてシーケンスを行い、当該領域内の遺伝子配列を決定する。この操作を異なるサンプル DNA を用いて行うことで、遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異を検出する。

【0006】

PCR-SSCP (Polymerase chain reaction-single stranded polymorphism) 法はヒトの遺伝子の解析したい領域を PCR 法で増幅した後、熱変性で一本鎖にし、これを非変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行うことで、PCR 法で増幅した 2 本鎖 DNA のそれぞれの鎖に 2 次構造（分子内水素結合）を形成させる。一塩基配列の違いによってとる 2 次構造（分子内水素結合）がことなるため、電気泳動距離の違いによって遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異を

検出する。

【0007】

アレル特異的ハイブリダイゼーション法では、解析したい領域をPCR法で増幅した後、メンブレン（ナイロンフィルター）の領域内に20塩基程度のPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドプローブを作成し、そこに放射性同位元素<sup>32</sup>Pなどで標識したサンプルDNA（被検出DNA）をハイブリダイゼーションさせるものである。その際の温度等のハイブリダイゼーション条件を調節することで、遺伝子の一塩基性SNPと点突然変異を放射性同位元素の強度の差で検出する。

【0008】

DNAチップ法は、原理的にはアレル特異的ハイブリダイゼーション法とほぼ同じであるが、20塩基程度のPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドプローブを固定相（基盤上）に並べ、そこに蛍光標識したサンプルDNA（被検出DNA）をハイブリダイゼーションさせるものである。温度等のハイブリダイゼーション条件を調節することで、ヒトの遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を蛍光強度の差によって検出するものである。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

アレル特異的ハイブリダイゼーション法におけるハイブリダイゼーションの場合は、DNAを放射性同位元素で標識するために、放射性同位元素の取り扱いと管理に多大な費用が有することが問題である。又、DNAチップ法の場合は、蛍光色素で標識すると、蛍光色素の大きな分子構造のために十分な頻度で蛍光がDNAにとりこまれないために、蛍光標識プローブの蛍光強度が高くないこと、さらに蛍光の退色及びガラス等の基盤の有する蛍光（背景部分の蛍光）が問題になる。

【0010】

このような問題点を解決するために、簡単で感度の優れたDNAハイブリッド形成の検出、二本鎖DNAを検出する方法として、プローブDNAを電極に固定し、このプローブDNAを、インターカレータ存在下においてサンプルDNAと

反応させて、二本鎖DNAの検出、ハイブリッド形成体の検出を電気化学的に行う方法が開示されている（特開平9-288080号公報及び第57回分析化学討論会予稿集、P137-138、1996年、参照）。

【0011】

しかしながら、遺伝子の一塩基置換SNPや遺伝子の突然変異の数は莫大であり、例えばヒトの場合15KBの密度（解像度）の一塩基置換SNP地図を作成するためには、すくなくとも200万の一塩基置換SNPを同定しなければならない。又、既知の疾患に係る遺伝子の点突然変異の数もきわめて多い。一塩基置換や点突然変異を網羅的に解析することは従来の方法では現実的に不可能に近い。

【0012】

本発明は、上記従来の問題点を解決することを目的とするものであり、複数のサンプルDNAを対象に、大量の一塩基置換SNPと点突然変異を検出、解析することが可能な、すなわちハイスループット（高速大量）の処理ができ、しかも高感度に検出と解析が可能な遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の同定装置を提供する。要するに、本発明は、特開平9-288080号公報に記載された二本鎖DNAの検出、ハイブリッド形成体の検出を電気化学的に行う原理に基づいて、大量かつ高感度な遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出・解析装置として実現しようとするものである。

【0013】

さらに、本発明は、実際の検出等の作業において、取り扱いが簡単で、作業しやすい遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップを実現しようとするものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記課題を解決するために、互いに着脱自在な本体部とフレーム部とを有する遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出用チップであって、上記本体部は、その内側面にマトリックス状に配列されて突出した測定極である多数のピン電極を有し、上記フレーム部は、その内側面に、上記本体部を装着した



際に上記多数のピン電極を受け入れることができるとともに、サンプルDNAを充填することのできる窪みを有し、上記窪みには上記ピン電極と接触しないように配置された対極である共通電極が配設されており、上記ピン電極は、異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されており、上記共通電極と上記ピン電極間に電圧が印加され、電流が検出されることが可能であることを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出用チップを提供する。

## 【0015】

上記ピン電極は、夫々マトリックス状に多数配列され、異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドを収容する収容部の各々に、挿入されることにより、上記異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されているものとしてもよい。

## 【0016】

又、本発明は、上記課題を解決するために、互いに着脱自在な本体部とフレーム部とを有する検出チップ、並びに該検出チップを装入及び取り出し可能な測定装置とから構成される遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置であって、上記本体部は、その内側面にマトリックス状に配列されて突出した測定極である多数のピン電極を有し、上記フレーム部は、その内側面に、上記本体部を装着した際に上記多数のピン電極を受け入れることができるとともに、サンプルDNAを充填することのできる窪みを有し、上記窪みには上記ピン電極と接触しないように配設された対極である共通電極が配設されており、上記ピン電極は、異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されており、上記共通電極と上記ピン電極間に電圧を印加し、電流を検出可能とすることが可能であることを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出用チップ、を提供する。

## 【0017】

上記検出チップの温度をペルチエ素子を用いコントロール可能としてもよい。

## 【0018】

さらに、本発明は、上記課題を解決するために、フレームの上記窪み内に、サ

ンプルDNA又はサンプルDNAから遺伝子増幅されたDNAを充填し、ハイブリダイゼーションを行わせて二本鎖を形成し、その後、上記サンプルDNA又はサンプルDNAから遺伝子増幅されたDNAを上記窪みから除去し洗浄してから、上記窪み内に、電気化学活性分子を含む電解質を充填して、温度をコントロールして上記二本鎖に上記電気化学活性分子を結合させ、そして、上記共通電極と上記ピン電極間に電圧を印加して流れる電流値を検出することにより、サンプルDNAの一塩基置換SNPと点突然変異を検出することを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出方法を提供する。

## 【0019】

## 【発明の実施の形態】

本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出方法、並びに検出装置及び検出チップの実施の形態を実施例に基づいて図面を参照して、以下説明する。図1において、本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置1は、ハイブリダイゼーション用の検出チップ2と、この検出チップ2を差し込んで、ハイブリダイゼーションにより生じる二本鎖DNAを検出し解析可能とする測定装置3とから構成される。

## 【0020】

図2は、検出チップ2の構造を示す図であり、図2(a)は、検出チップ2の全体斜視図を示しており、これは、カードあるいはカセット状のチップとして形成されている。図2(b)に斜視図として示すように、検出チップ2は、セラミックスや合成樹脂材等により形成されたフレーム4と、該フレーム4に着脱可能に装着される本体部5とから構成される。

## 【0021】

フレーム4に対して本体部5着脱可能とする構成は、例えば、互いに弾性的に嵌合する凹凸をフレーム4と本体部5の当接面に夫々形成することにより可能である。本実施例では、図2(b)、(c)、図3(a)、図5(a)に示すように、本体部に凸部6を、フレームに凹部7を設け係脱可能とした。このように、フレーム4と本体部5を互いに着脱可能とする構成は、クリップ又はクランプで止めたり、磁石により互いに吸着させたり、その他いろいろな構成が可能である。

## 【0022】

フレーム4のほぼ中央には、矩形の窪み8が形成されている。この窪み8の周囲には、シール9が付設されている。この窪み8内には後述するように、溶液（サンプルDNA、縫い込み式インターカレーター、洗浄液等）を充填することができ、本体部5をフレーム4に装着することにより封止される。又、本体部5をフレーム4からはずすことにより、窪み8内の溶液の交換や混合、洗浄等を迅速に行うことができる。

## 【0023】

一方、本体部5には、図2（c）に示すように、フレーム4の窪み8に対応する領域に、多数のピン電極10がマトリックス状に植設されている。ピン電極10の突出長さは、本体部5をフレーム4に装着した際、窪み8内に収まる長さである。

## 【0024】

図3（a）は、図2（c）のA-A断面を示す図であり、本体部5の構成と、ピン電極10の植設されている状態を示している。本体部5は、概略、内側壁11と外側壁12との間に回路基板13が配設されて構成される。この回路基板13の表面には図4において示す配線21、22、23等を含む回路が形成されている。

## 【0025】

ピン電極10は、図3（a）、（b）に示すように、回路基板13から内側壁11を貫通して突出するように構成される。又は、ピン電極10は、図3（c）に示すように、外側壁12から回路基板13及び内側壁11を貫通して突出するように構成してもよい。或いは、ピン電極10は、図3（d）に示すように、本体部5を、基台14上に回路基板13を配設して成る構成とし、ピン電極10をこの回路基板13上に植設するような構成としてもよい。

## 【0026】

ピン電極10の表面には、図6（b）でその拡大図を示すように、PCR産物、オリゴヌクレオチドの5'末端にチオール化してSH基を導入したSH化オ

リゴヌクレオチド 16 が固定されている。PCR 産物は二本鎖 DNA であるが、一方の鎖の 5' 末端をチオール化し、SH 基を導入してあるこのオリゴヌクレオチドは、20～50 塩基含む長さを有し、その基端に導入したチオール基を介してピン電極 10 上に固定されている。

## 【0027】

このオリゴヌクレオチドの固定は、図 6 (a) に示すように、ピン電極 10 を、ピン電極 10 と同じピッチ配列された DNA 収容部 18 を有するマイクロプレート 17 の各収容部 18 内に、挿入することにより、同時に種類の異なる DNA を同時に修飾して行うことが可能である。

## 【0028】

多数のピン電極 10 は、回路基板 13 の上にマトリックス上に配設され、電気的にも回路基板の一部となるように構成されている。そして、図 2 (c) に示すように、本体部 5 の先端部 19 には、多数のターミナル端子 20 が並設されている。図 4 (a)、図 3 (a)、(b) に示すように、ピン電極 10 は、夫々回路基板上の配線 21 に接続され、該配線 21 の他端は、ターミナル端子 12 の夫々と結合するように伸設されている。

## 【0029】

なお、予め回路基板上にスポット電極 15 をマトリックス状に配列して蒸着し、多数のスポット電極 15 から構成されるアレー状電極を形成しておき、ピン電極 10 の基端部は、図 3 (e) に示すように、このスポット電極 15 上に電氣的に接触した状態で植設してもよい。

## 【0030】

図 4 (a) に示すように、ピン電極 10 に対する配線 21 は、ピン電極 10 それぞれに対応して一本ずつ接続してそれぞれターミナル端子 20 に接続してもよいが、図 4 (b) に示すように、TFT 液晶表示装置等のマトリックス電極のように、多数の縦及び横の導線 22、23 から成るマトリックス配線の交差部で、夫々マトリックス配線の導線 22、23 とピン電極 10 が FET (電界効果型トランジスタ) 24 を介して接続するような構成としてもよい。このような構成とすると、縦及び横の導線 22、23 が走査され、選択された FET 乃至ピン電極

1 0 だけが電氣的に接続されるようになる。

【0 0 3 1】

本実施例では、さらに、図 4 で示す共通電極 2 5 を有する。図 4 で示す共通電極は、あくまでも回路構成を説明するために模式的に記載しているものであり、実際は、窪み 8 に配設されるものである。例えば、共通電極 2 5 は、図 5 (a) に示すように、窪み 8 の底面の一部（例えば周縁等）又は全面、或いは窪み 8 の底面近くの内周側面等に、ピン電極 1 0 の対極として配設されている。そして、共通電極 2 5 は、ピン電極 1 0 と接しない位置に設けられている。共通電極 2 0 は、本体部 5 をフレーム 4 に装着すると、図 5 (b) に拡大図で示すように、本体部 5 の共通電極用の端子 2 6 と接触するように構成されている。そして、この共通電極用の端子 2 6 は、共通電極用ターミナル端子 2 7 に配線 2 8 を介して接続されている。

【0 0 3 2】

なお、それぞれのピン電極 1 0 と対極である共通電極 2 5 の間の電流値は、窪み 8 内の空間に後述する電解質溶液を充填した場合にこの電解質溶液に接するように配線された参照電極（図示せず）の値を基準に測定され、測定ごとに正確な電流値が得られる構造としてもよい。

【0 0 3 3】

測定装置 3 は、検出チップ 2 を差し込む挿入口 2 9 を有している（図 1 参照）。挿入口 2 9 の内部には、図 4 (c) で示すように、共通電極用ターミナル端子 2 7 及び各ピン電極用ターミナル端子 2 0 に接続して、共通電極用ターミナル端子 2 7 及び各ピン電極用ターミナル端子 2 0 間に電圧を印加する回路 3 0 が配設されている。

【0 0 3 4】

そして、共通電極用ターミナル端子 2 7 と各ピン電極用ターミナル端子 2 0 間に電圧 E が印加された際に、共通電極 2 5 と各ピン電極 1 0 の間に流れる電流を、回路 3 0 に設けられた検出器 3 1 で検出して測定できるような構成とされている。

【0 0 3 5】

なお、ピン電極 1 0 のターミナル端子 2 0 を選択的に接続するためには、測定装置 3 には、検出チップ 2 を挿入口 2 9 から差し込んだ場合に、各ピン電極用ターミナル端子 2 0 と接続するための受け端子 3 2 と、受け端子 3 2 を回路 3 0 に選択的に接続するための走査端子 3 3 とが設けられている。

#### 【 0 0 3 6 】

この検出した電流に基づく測定データは、検出器 3 1 に接続する A - D 変換器 3 4 等でデジタル化され、パソコン 3 5 によりサンプル DNA の解析、同定等の処理データとして利用される。

#### 【 0 0 3 7 】

さらに、測定装置 3 には、ペルチェ素子から成る温度コントロール装置（図示せず）が装備されている。この温度コントロール装置により、後述するハイブリダイゼーションの温度条件をコントロールすることができる。

#### 【 0 0 3 8 】

以上のような構成から成る本発明に係る遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異の検出装置 1 の作用について説明する。図 6（a）は、ピン電極 1 0 と同じピッチで収容部 1 8 がマトリックス状に配列されたマイクロプレート 1 7 である。このマイクロプレート 1 7 の各収容部 1 8 内に、種類の同じ又は異なる DNA を収容しておく。

#### 【 0 0 3 9 】

そして、図 6（a）に示すように、検出チップ 2 の本体部 5 の多数の電極ピン 1 0 を、夫々収容部 1 8 に挿入する。これにより、図 6（b）にその一部拡大図を示すように、夫々の電極ピン 1 0 に種類の同じ又は異なる DNA を修飾することができる。

#### 【 0 0 4 0 】

一方、フレーム 4 の窪み 8 内にサンプル DNA 溶液を注入し充填する。そして、この窪み 8 内に、上記 DNA の修飾された多数のピン電極 1 0 を装入するように、本体部 5 をフレーム 4 に、凸部と凹部を係合して装着する。すると、窪み 8 内はシール 9 で封止され、共通電極 2 5 は、本体部 5 の共通電極用の端子 2 6 と接触する。

【 0 0 4 1 】

なお、サンプルDNAは、生物材料から抽出したDNAを、DNA分解酵素もしくは超音波処理で分解したもの、又は特定の遺伝子からPCR（ポリメラーゼ連鎖反応法）によって増幅したDNAを用いる。これらのサンプルDNAは、ハイブリダイゼーションの直前に熱処理によって変性しておく。

【 0 0 4 2 】

固定されたPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドのDNA（一本鎖の状態）にサンプルDNA（一本鎖の状態）が添加されると、互いに相補的な塩基配列を持つPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドのDNAとサンプルDNAは、ハイブリダイゼーションが行われる。

【 0 0 4 3 】

このハイブリダイゼーションの際、検出チップ2を測定装置3内の挿入口22に挿入して装着し、測定装置3内に装備されたペルチェ素子から成る温度コントロール装置により、ハイブリダイゼーションの温度条件にコントロールする。

【 0 0 4 4 】

このハイブリダイゼーションが行われた後、検出チップ2を測定装置3から抜いて、本体部5をフレーム4から外す。そして、窪み8内のサンプルDNA溶液を除去して、窪み8内に洗浄液を注入し、ハイブリダイゼーションしなかったサンプルDNAを洗い流して洗浄する。

【 0 0 4 5 】

このような洗浄を行った後に、電気化学活性分子を含む電解質溶液を窪み8内に充填し、本体部5をフレーム4に装着する。電気化学活性分子は、ハイブリダイゼーションにより二本鎖DNAの抵抗値等の電気的特性を変化させる機能を奏する。この点については、特開平9-288080号公報に詳細に説明されている。

【 0 0 4 6 】

このような処理を行った検出チップ2を測定装置3に再度装着し、検出チップ2の共通電極用ターミナル端子27及び各ピン電極用ターミナル端子20を、測定装置の受け端子32に接続し、選択スイッチを介して電圧回路30に接続し、

共通電極 25 と各ピン電極 10 の間に弱い電圧をかけると、ハイブリダイゼーションにより生じた二本鎖 DNA と接続されたピン電極 10 には、電圧回路 30 及び共通電極 25 を通して微弱電流が流れる。測定装置 3 内に装備されたペルチエ素子により温度をコントロールし、異なる温度での電流値を測定する。

【0047】

測定装置 3 では、図 4 (c) に示すように、各ピン電極用ターミナル端子 20 及び受け端子 32 に対して走査端子 33 を切り替える（切り替えは、自動又は手動で行うことが可能であるが、その構成はこの発明の要旨ではないので説明は省略する。）ことにより、順次ハイブリダイゼーションの後の二本鎖 DNA に電流が流れて、検出器 31 で検出される。

【0048】

この検出結果が、A-D変換器 34 によりデジタルデータに変換されて、パソコン 35 で測定データとしてメモリ等に蓄積される。この測定データにより、サンプル DNA の同定や解析が行われる。例えば、予め蓄積されている各種類の DNA データ等と比較することにより、サンプル DNA の解析や同定が可能となる。

【0049】

次に本発明に係わる遺伝子の塩基置換、点突然変異等の電気化学的検出装置の実験例を説明する。

【0050】

—(実験例-1)—

遺伝子 p53 の 72 番目のコドンにおける一塩基置換 SNP の検出の実験例を示す。以下の 2 種類のポリモルフィズム（遺伝的多型）に相当する塩基配列をもつオリゴヌクレオチドをピン電極 10 それぞれにスポットすることにより固定化した。

p53Pro（コドン 72 番目が Pro）

p53Arg（コドン 72 番目が Arg）

【0051】

これに p53 のコドン 72 番目が Pro であるの正常人の末梢血から採取した DNA、及びこの DNA から p53 のエキソン 4 に存在するコドン 72 を含む領域を増幅した PCR 産



物を熱変性後ハイブリダイゼーション反応を行った。測定電解質溶液として0.1M AcOH-AcOK (pH5.6), 0.1M KCl, 0.05mM NfC中で20度で470 mV (Ag/AgCl参照電極基準)のハイブリダイゼーション前後の電流値変化を測定した。

末梢血から採取したDNA

p53Proの電流変化(%) -52%

p53Argの電流変化(%) 15%

PCR産物

p53Proの電流変化(%) 65%

p53Argの電流変化(%) 13%

【0052】

さらにp53のコドン72番目がArgである正常人の末梢血から採取したDNA、及びこのDNAからp53のエキソン4に存在するコドン72を含む領域を増幅したPCR産物を同様にハイブリダイゼーション反応を行った。

末梢血から採取したDNA

p53Proの電流変化(%) 46%

p53Argの電流変化(%) 17%

PCR産物

p53Proの電流変化(%) 53%

p53Argの電流変化(%) 11%

【0053】

これらの電流変化は、完全にマッチした塩基配列の場合とミスマッチの場合では明らかな差が認められた。

【0054】

(実験例2)

塩基置換の数によって測定する電流値が異なり、これによりミスマッチの量が測定できることを示した実験例を説明する。dT20, dT10dAdT9, dT8dA4dT8, dAdT19, dA3dT17, dT19dA, dT17dA3の7種のオリゴヌクレオチドをピン電極10それぞれにスポットすることにより固定化した。これにdA20をハイブリダイゼーション反応を行った。

## 【0055】

測定電解質溶液として0.1M AcOH-AcOK (pH5.6)、0.1M KCl、0.05mM NFe中、20度で、470mV (Ag/AgCl参照電極基準)で、ハイブリダイゼーション前後の電流値変化を測定した。この測定結果を表1に示す。

## 【0056】

【表1】

	dT20	dT10dAdT9	dT8dA4dT8	dAdT19	dA3dT17	dT19dA	dT17dA3
電流変化 (%)	37	22	15	14	14	20	12
Tm (度)	46	36	21	45	46	42	41

## 【0057】

表1における電流変化は、ほぼミスマッチ塩基の量に依存した変化であった。特に末端部にミスマッチが存在する場合は、Tm値より大きな変化が見られた。従来のSSCPでは、このような系は検出できなかったが本手法で初めて明らかとなった。

## 【0058】

以上、本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップ2について、その実施例で説明したが、本発明は、特にこのような実施例に限定されることはなく、特許請求の範囲の技術的事項の範囲内で、いろいろな実施の態様があることは言うまでもない。

## 【0059】

## 【発明の効果】

本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップ2は、以上のような構成であるから、複数のサンプルDNAを対象に、大量の一塩基置換SNPと点突然変異を高感度でもって、検出、解析することが可能になる。

## 【0060】

このように、高感度、ハイスループット（高速大量）の処理ができる本発明に係る検出装置は、生物学、医学分野での遺伝子、表現形質との相関の解析に有効な手段である。薬剤代謝酵素、がん抑制遺伝子などの特定の遺伝子を、本発明に係る一塩基置換 S N P と点突然変異の検出・解析装置によって、解析することにより、遺伝子診断の分野にも利用できる。

【 0 0 6 1 】

例えば、本発明に係る検出装置では、高感度、ハイスループット（高速大量）の処理が可能であるから、日本人の一塩基置換 S N P と点突然変異のデータを収集し、病気の発症と関連する一塩基置換 S N P と点突然変異を同定し、がん、高血圧などの成人病の予防等に役立てることができる。

【 0 0 6 2 】

本発明では、検出チップを互いに着脱自在な本体部とフレーム 4 構成し、フレームにサンプル D N A 溶液等を充填できる窪みを形成したので、サンプル D N A 、縫い込み式インターカレーター等の溶液を、極めて簡単な作業で充填したり取り出したりできるとともに、窪み内を洗浄液で簡単に洗浄をすることができる。

【 0 0 6 3 】

本発明では、検出チップの測定極として、本体部の内側にマトリックス状に配列したピン電極を突出して設けたので、ピン電極を、異なる D N A を収容したマイクロプレートの収容部内に挿入することにより、同時に種類の異なる D N A を一度に修飾させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係る遺伝子の一塩基置換 S N P と点突然変異を検出する検出装置の実施例の全体構成を説明する斜視図である。

【図 2】

本発明に係る遺伝子の一塩基置換 S N P と点突然変異を検出に利用される検出チップの実施例の全体構成を説明する斜視図である。

【図 3】

図 3（a）、（b）は、図 2（c）の A - A 断面及びその要部拡大図を示し、

図 3 ( c ) ~ ( e ) は、ピン電極を植設するいろいろな構造を示している。

【図 4】

本発明に係る遺伝子の一塩基置換 S N P と点突然変異の検出装置及び検出チップの電極、配線等の構成を説明するための図である。

【図 5】

図 2 の検出チップの断面図及びその要部拡大図である。

【図 6】

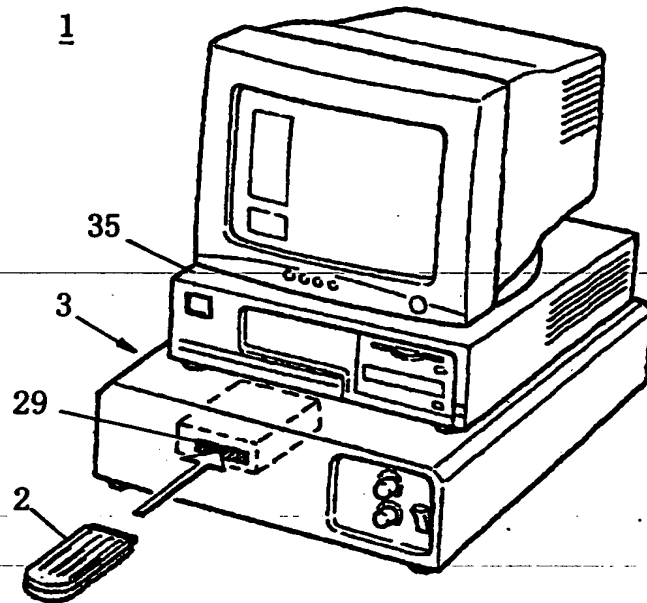
本発明に係る遺伝子の一塩基置換 S N P と点突然変異を検出に利用される検出チップの実施例の使用状態を説明する斜視図である。

【符号の説明】

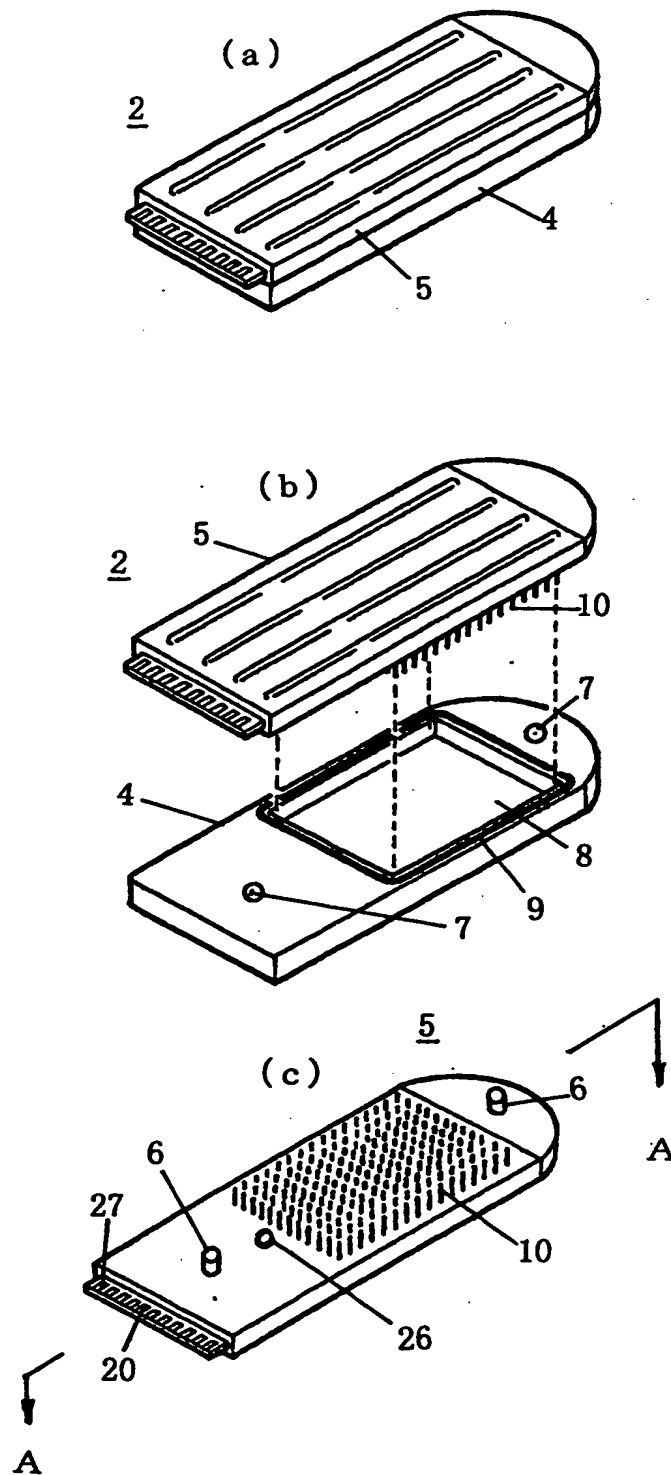
- 1 遺伝子の一塩基置換 S N P と点突然変異を検出する検出装置
- 2 検出チップ
- 3 測定装置
- 4 検出チップのフレーム
- 5 検出チップの本体部
- 8 窪み
- 1 0 (各) ピン電極
- 1 3 回路基板
- 1 4 本体部の基台
- 1 6 オリゴヌクレオチド
- 1 7 マイクロプレート
- 1 8 マイクロプレートの収容部
- 2 0 ピン電極用ターミナル端子
- 2 5 共通電極
- 2 7 共通電極用ターミナル端子
- 2 8 配線
- 2 9 測定装置の挿入口
- 3 1 検出器
- 3 5 パソコン

【書類名】 図面

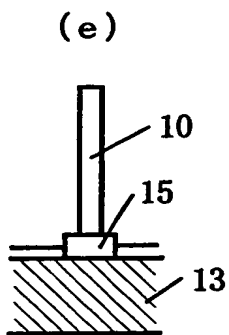
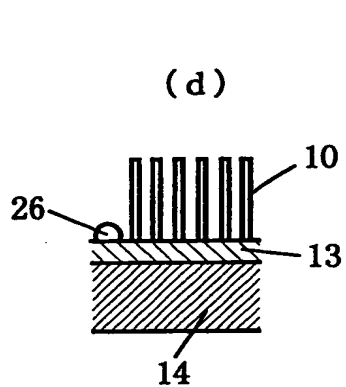
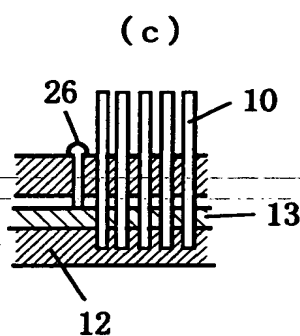
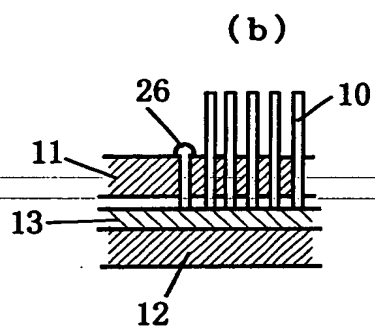
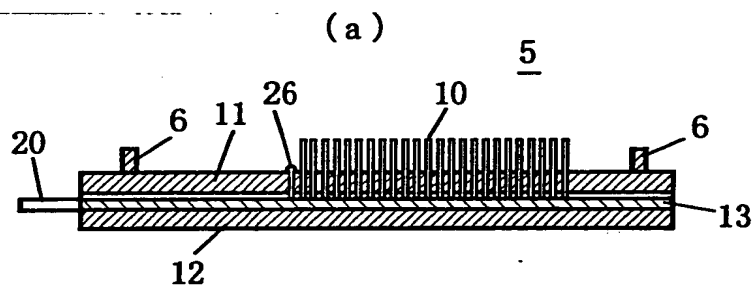
【図 1】



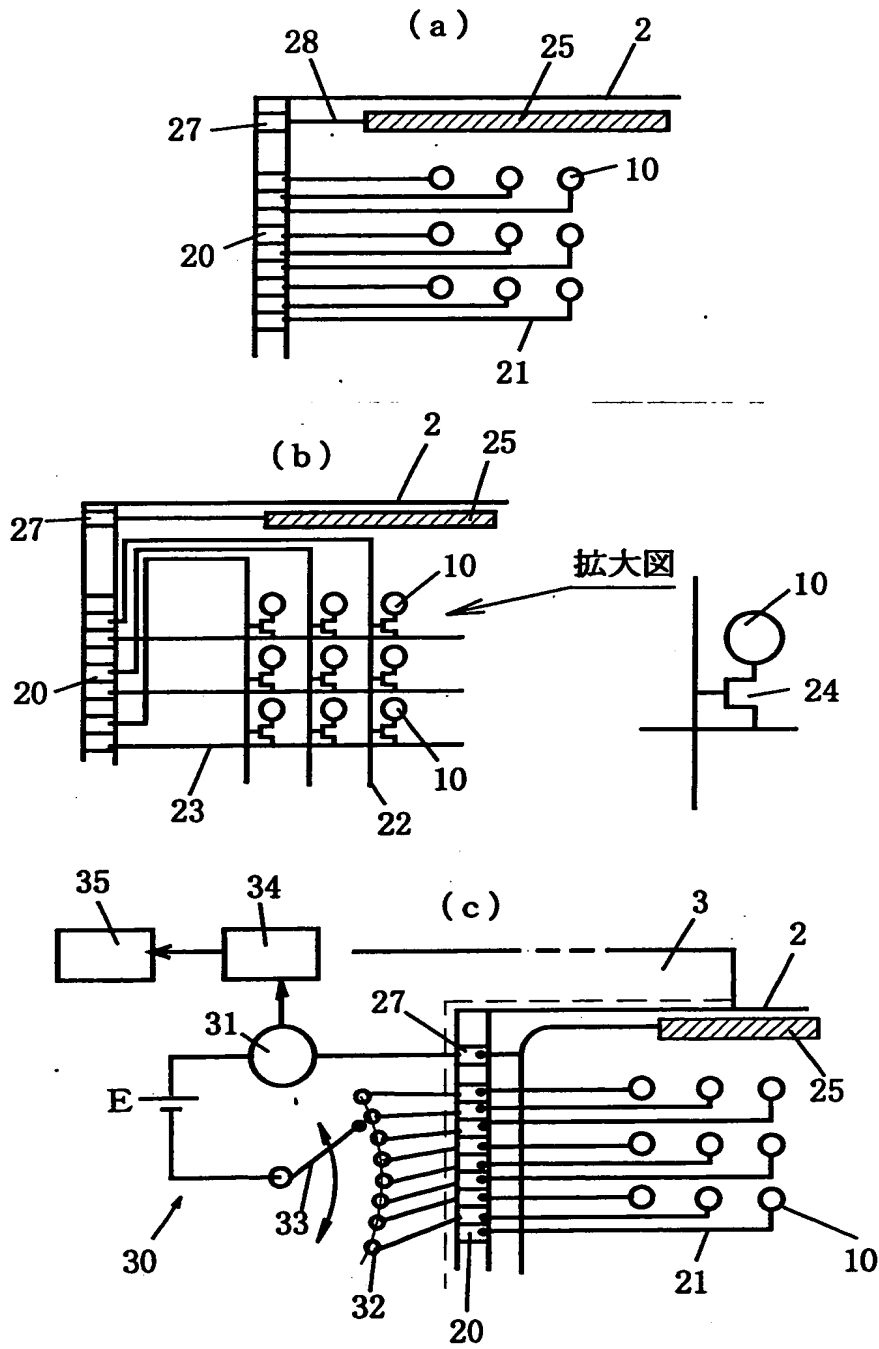
【図 2】



【图 3】

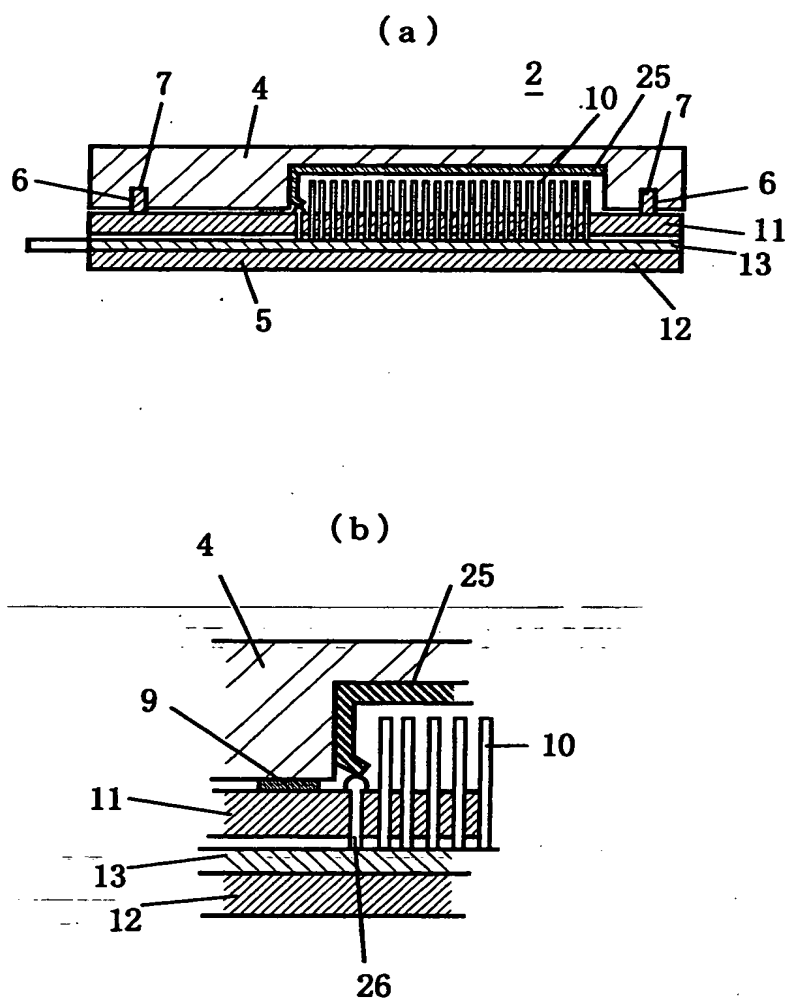


【図 4】

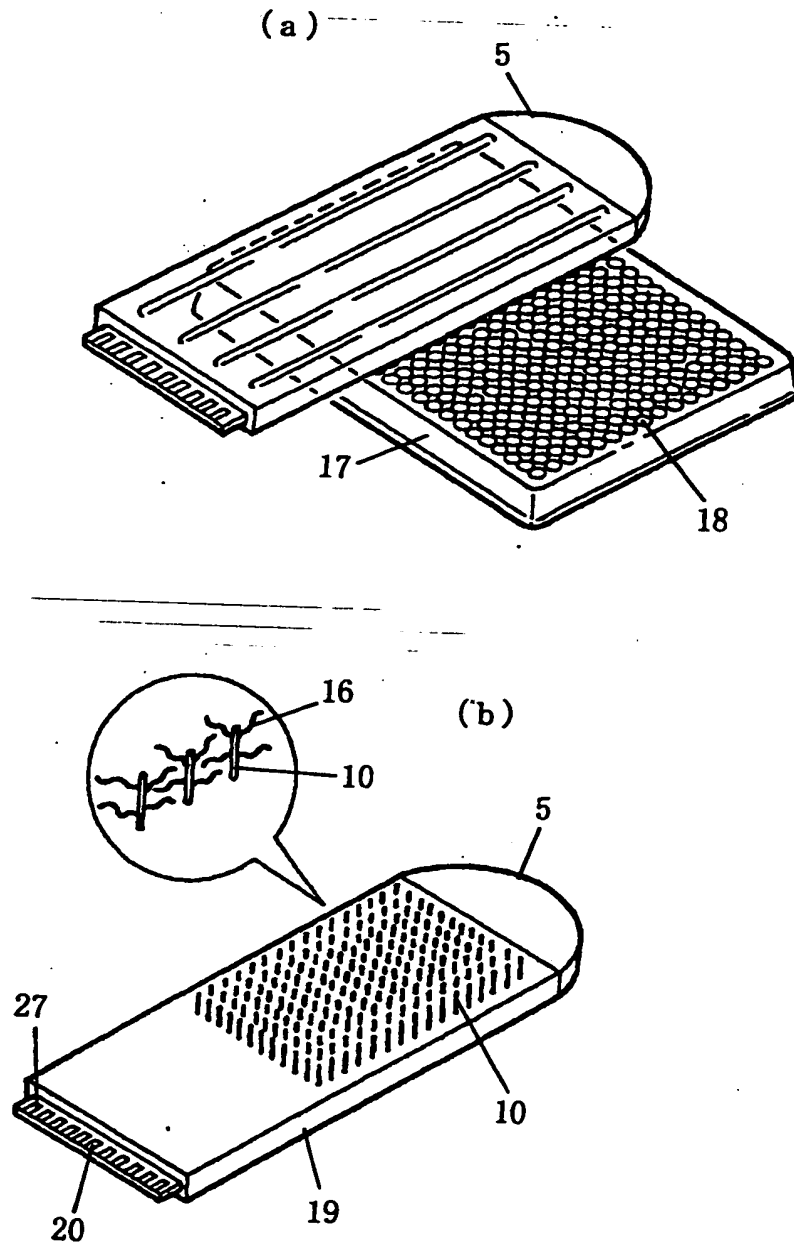




【図 5】



【图 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 複数のサンプルDNAを対象に、大量の一塩基置換SNPと点突然変異を高感度に検出、解析を可能とする。

【解決手段】 検出チップ2は、互いに着脱可能な本体部5とフレーム4とから成り、本体部5の内側にはマトリックス状に多数のピン電極10が突出されており、このピン電極10には異なる遺伝子配列から成るオリゴヌクレオチドが固定されており、このピン電極10と接触しないようにフレーム4の窪み8に共通電極が配設されており、窪み8にサンプルDNAを充填し、共通電極とピン電極10間に電圧を印加し、電流を検出してハイブリリタイゼーションした二本鎖DNAを検出し、解析可能とする。

【選択図】 図2

特平11-298917

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第298917号
受付番号	59901027773
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成11年10月22日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年10月20日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [594079615]

1. 変更年月日	1994年 5月13日
[変更理由]	新規登録
住 所	千葉県千葉市美浜区高浜6丁目19-15
氏 名	宮原 孝俊

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [399045949]

1. 変更年月日 1999年 7月23日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市松代5-16-527-201

氏 名 内田 和彦

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [399045950]

1. 変更年月日 1999年 7月23日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 福岡県古賀市舞の里4-23-21  
氏 名 竹中 繁織

